植 物 分 类 与 资 源 学 报　2011, **33** (3): 330～334
Plant Diversity and Resources　DOI: 10.3724/SP.J.1143.2011.11021

花粉发育相关基因 *BcMF13* 不同转录本的克隆及分析*

聂传朋，李焰焰**
（阜阳师范学院 生命科学学院，安徽 阜阳　236041）

摘要：在克隆花粉发育相关基因 *BcMF13* 时，用 RACE 技术进行 3′端扩增，得到了两个不同长度的 3′转录本。与 EST 库比对，发现与其相似性高的序列都来源于十字花科芸薹属、萝卜属等植物的生殖器官，并且在这些近源属中也出现不同转录本。这些不同转录本的存在说明 *BcMF13* 存在剪切异构体，调控过程灵活复杂，反映出该基因具有重要功能。同时，对 *BcMF13* 基因的 RT-PCR 表达研究表明，它只在可育株系中表达，在不育株系中不表达，且主要集中在大花蕾、雄蕊中表达。分析 *BcMF13* 推导的蛋白结构，发现其编码的蛋白包含多个生物活性位点。以上结果均表明 *BcMF13* 与花粉育性相关，多个剪切异构体的发现说明 *BcMF13* 在执行生理功能时较为活跃。

关键词：*Brassica campestris Male Fertility 13* (*BcMF13*)；RACE；3′ 转录本
中图分类号：S 634.3，Q 78　**文献标识码**：A　**文章编号**：2095-0845(2011)03-330-05

The Clone and Analysis on Different Lengths of 3′ Transcription of *BcMF13* from *Brassica rapa* ssp. *chinensis* (Cruciferae)

NIE Chuan-Peng, LI Yan-Yan**
(*School of Life Sciences*, *Fuyang Teachers College*, Fuyang 236041, China)

Abstract: Two different lengths of 3′ transcripts were got in cloning the pollen development gene *BcMF13*, using RACE technology. Compared with the EST database and found that their high sequence similarity are derived from cruciferous *Brassica*, *Raphanus*, plants' reproductive organs, and different transcripts were also found in these sources. The existence of these different transcripts exist that *BcMF13* shear isomers, flexible and complex regulation of the process, reflecting the important function of the gene. Expression analysis of RT-PCR have shown that *BcMF13* only expressed in fertile lines, no in sterile lines, and mainly concentrated in the large flower buds and stamen. Analysis of the deduced protein structure of *BcMF13* found that the proteins encoded multiple biological active sites. These results show that *BcMF13* was late expression gene on pollen fertility. *BcMF13* was active in the implementation of physiological function.

Key words: *Brassica campestris Male Fertility 13* (*BcMF13*); RACE; Different lengths of 3′ transcription

采用 cDNA-AFLP 技术从白菜减数分裂胞质分裂异常突变体 *mmc* (*male meiotic cytokinesis*) 对应的野生型中发现其中一个长度为 191 bp 的片段 A8T4，这个片段与网上发布的序列同源性都很低，说明该片段很可能属于一个新基因。为了获得该基因，用 RACE (rapid amplifi-cation of cDNA ends) 技术对 A8T4 差异片段分别进行 3′端 RACE 和 5′端 RACE 序列扩增。在克隆该基因

* 基金项目：国家自然科学基金“多肽激素类基因 RALF 在油菜花粉发育中的功能研究”(31000132)、安徽省高校青年教师资助项目“植物肽类激素 RALF 基因的分离和遗传转化”(2008jq1121)
** 通讯作者：Author for correspondence; E-mail: liyanyan1976@yahoo.com.cn
收稿日期：2011-01-30，2011-03-10 接受发表
作者简介：聂传朋 (1974-) 男，博士生，高级实验师，研究方向：动植物种质资源评价与遗传多样性研究。
E-mail: niechp1974@126.com

的 3′端序列时，得到了两个长度不同的转录本。随后的表达分析发现，该基因主要集中在白菜可育株雄蕊中表达，在不育株中不表达，说明该基因是白菜花粉发育中的相关基因，因此把长的转录本和 5′端序列拼接后得到的 cDNA 全长序列命名为 *Brassica campestris Male Fertility 13*（*BcMF13*，雄性可育基因 13），并递交 GenBank（登陆号：EF158459）。

把 *BcMF13* 在 NCBI 中 BLAST 比对，未发现与其有相似性的基因，说明 *BcMF13* 是一个新基因。把 *BcMF13* 与 EST 库比对，发现与其相似性高的序列都来源于十字花科芸薹属、萝卜属等植物的生殖器官，它们应该属于一个基因家族。并且在这些近源属中的家族基因中也存在有不同的转录本。这些不同转录本的存在说明 *BcMF13* 存在剪切异构体，调控过程灵活复杂，反映了该基因在功能上的重要性，有一定的研究价值。

1　材料与方法

1.1　材料

植物材料选用浙江大学蔬菜研究所多年培育的‘矮脚黄’白菜核雄性不育两用系（*Bajh97-01A/B*），遗传性状稳定，可育株与不育株分离比例为 1∶1，育性由一对等位基因控制，不育株系（*Bajh97-01A*）为雄配子减数分裂胞质分裂（*male meiotic cytokinesis*，*mmc*）突变体，可育株系（*Bajh97-01B*）为其对应的野生型，可用于核雄性不育的研究（Ye 等，2003；Yu 等，2004；Li 等，2011）。

1.2　*BcMF13* 基因 3′不同转录本的 RACE 扩增

DNA 提取参照曹家树等（1995）并略加改进。总 RNA 的提取及分离参照 Life Technologies 公司 TRIzoL®的说明书进行。cDNA 第一链和第二链的合成参照 SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit User Manual 方法进行。根据双链 cDNA 合成试剂盒的特征设计 3′RACE 锚定引物 P3（5′-GAGGCGGCCGACATGTTTTT-3′）；并根据由 AFLP 技术得到的差异片段序列设计正向特异引物 SP1（5′-ACACGTAATTTATCTGCTTCCG-3′）用 3′RACE 扩增 3′末端。以双链 cDNA 为模板，进行 RACE 扩增。PCR 产物用 VITAGENE 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收后插入 pGEM-T easy 载体，转化大肠杆菌，蓝白斑筛选阳性克隆，碱裂解法抽提质粒，经 PCR 鉴定后，重组质粒送上海博亚生物公司测序。

1.3　*BcMF13* 基因的表达分析

基因表达分析取材，幼苗期取‘矮脚黄’白菜幼嫩叶片，莲座期取莲座叶，在抽薹期和开花期，分别取花茎叶、花茎、五级花蕾［花蕾大小的分级标准是：I 级（横径<1.0 mm），II 级（横径 1～1.6 mm），III 级（横径 1.6～2.2 mm），IV 级（横径 2.2～2.8 mm），V 级（横径>2.8 mm）］、开放花、嫩角果，另外对可育株的 IV、V 级大花蕾又分别取了萼片、花瓣、雄蕊和雌蕊四份材料，取材后用纱布包好，立即投入液氮中固定，于 −75℃保存备用（Huang 等，2008）。开花期调查编号植株的育性，根据育性鉴定结果，分别取同一时期、同一育性的 15 份总 RNA 混合备用。

以反转录的双链 cDNA 为模板，根据 *BcMF13* 的 cDNA 序列设计引物 P1：5′-CGGGGAACCATCAAACTAGTA-3′、P2：5′-CAAAAGGAGAGAAATAGGTTA-3′做 RT-PCR，以 β-actin 作为内参对照。

1.4　*BcMF13* 及其家族基因 3′不同转录本的序列分析

将获得的 *BcMF13* 基因序列与网上的 EST 库进行搜寻比较，得到的相似性极高的几个 cDNA 3′-mRNA 序列。用 MEGA 4.1 软件完成 *BcMF13* 及其同源基因的 cDNA 全序列对齐和同源性序列的多重排定，进行序列比对，并根据 Kimura 双参数模型计算遗传距离（D），相应的标准误差用 Bootstrap 方法（replications = 1000），通过 MEGA 3.1 软件得出 NJ 系统树，系统树中节点的自举置信水平（bootstrap confidence level，BCL）应用自引导（bootstrap）估计，共 1000 次循环（张弢，2009）。

2　结果与分析

2.1　*BcMF13* 基因 3′不同转录本的 RACE 扩增

用 RACE 技术对 A8T4 差异片段进行 3′端 RACE 扩增。用 A8T4 的正向引物 SP1 和 3′锚定引物配对进行 3′RACE 扩增，同时分别用 SP1、3′锚定引物做单引物验证以排除杂带的干扰（图 1），结果表明，扩增获得 2 条特异条带，长度均在 200 bp 到 300 bp 之间。而单引物均没扩增出条带，将回收的 2 个条带分别连接到 T-easy 载体上，转化大肠杆菌 DH5α。经蓝白斑筛选、酶切鉴定后，取切出正确长度的菌液送出测序。

测序结果表明，3′RACE 扩增的两个片段与 A8T4 原始片段重复部分的碱基序列完全一致。扣除引物序列，长片段克隆出 238 个碱基，序列结尾有一长度为 16 bp 的 poly A 结构，短片段克隆出 139 个碱基，序列结尾有一长度为 25 bp 的 poly A 结构，这表明 A8T4 差异片段的 3′RACE 已获得成功，得到了两个转录本。

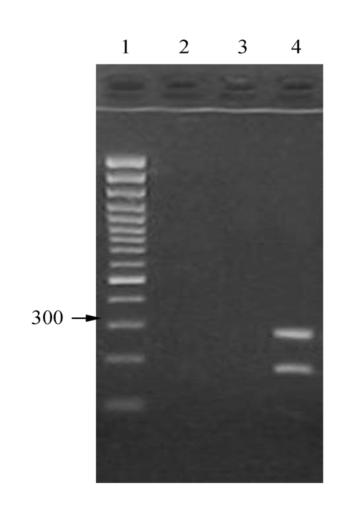


图1 *BcMF13* 基因的3′ RACE扩增

泳道1表示GeneRuler™ 3000-bp ladder的DNA marker；泳道2和3分别表示引物SP1和3′锚定引物的单引物扩增；泳道4表示SP1和3′锚定引物的双引物扩增

Fig. 1 3′ RACE products of *BcMF13*

Lane 1 indicates GeneRuler™ 3000-bp DNA ladder plus marker; lane 2, lane 3 respectively indicates the products of specific primer SP1 or 3′ anchor primer; lane 4 indicates the products of the two primers

2.2 *BcMF13* 基因的表达分析

以'*Bajh97-01A*'和'*Bajh97-01B*'的Ⅰ–Ⅴ级花蕾、开放花、嫩角果、茎和叶片以及可育株的萼片、花瓣、雄蕊和雌蕊等组织的双链cDNA为模板，用引物P1、P2进行RT-PCR，以β-actin作为内参对照（图2），进行表达分析，发现*BcMF13*只在可育株系的某些部位中检测到表达信号，不育株系的相应部位均没表达信号。主要在可育株系的Ⅳ、Ⅴ级花蕾中表达，在茎、叶等营养器官中没有表达。其中，Ⅴ级花蕾中表达很弱。在Ⅳ级以上的花蕾中具体部位的表达显示，*BcMF13*主要在雄蕊中表达，在花瓣也检测到极微弱的表达。

2.3 *BcMF13* 及其家族基因3′不同转录本的序列分析

将*BcMF13*在GenBank数据库用blast软件进行同源性搜索，没有发现同源性很高的基因，表明*BcMF13*是一个新基因。但是EST序列中发现了几个相似性高达96%～98%的序列（GenBank登陆号：FD565900.1、FD937165.1、EX898717.1、FD961331.1、EX777643.1）（表1）。这些序列均来源于萝卜属植物的花药、花蕾等生殖器官。

表1 *BcMF13* cDNA的EST比对

Table 1 The blast result of *BcMF13* cDNA in EST database

登陆号 Accession numbers	物种 Species	来源器官 Organs
FD565900.1	*Raphanus sativus* var. *oleiformis*	幼苗、花蕾和花药
FD937165.1	*Raphanus sativus* var. *oleiformis*	幼苗、花蕾和花药
EX898717.1	*Raphanus sativus*	幼苗、花蕾和花药
FD961331.1	*Raphanus raphanistrum* subsp. *maritimus*	幼苗、花蕾和花药
EX777643.1	*Raphanus raphanistrum* subsp. *landra*	幼苗、花蕾和花药

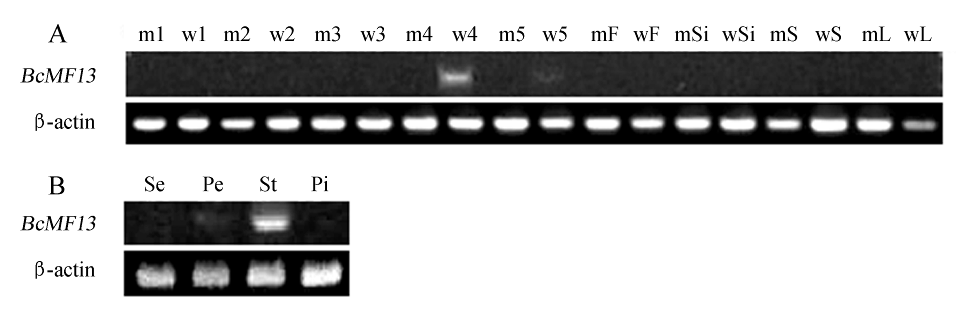


图2 *BcMF13* 在白菜核隐性雄性不育两用系各组织中的表达

（A）m1、m2、m3、m4、m5、mF、mSi、mS、mL、分别指不育株的Ⅰ～Ⅴ级花蕾、开放花、嫩角果、茎和叶片；w1、w2、w3、w4、w5、wF、wSi、wS、wL、分别指可育株的上述部分；（B）Se、Pe、St、Pi分别指可育株的萼片、花瓣、雄蕊和雌蕊。Actin为内参对照

Fig. 2 RT-PCR analysis of the spatial and temporal expression pattern of *BcMF13*

(A) m1, m2, m3, m4, m5, mF, mSi, mS, mL indicate stage Ⅰ–Ⅴ flower bud, open flower, germinal silique, scape, leave of the sterility line respectively, w1, w2, w3, w4, w5, wF, wSi, wS, wL indicate the above of the fertile line respectively, (B) Se, Pe, St, Pi indicate sepal, petal, stamen and pistil of the fertile line respectively. β- actin is internal control

把 *BcMF13* 的两个 3′不同转录本和以上几条 EST 序列所代表的 cDNA 的 3′端进行序列同源比对（图 3）。*BcMF13* 的两个 3′不同转录本在编码区（终止密码子之前）内只发生一次颠换（G-T）。在 3′UTR 区，各个序列之间的核苷酸差异比较明显。

用 NJ 法构建 *BcMF13* 及各基因间的关系树（图 4）。聚类分析结果表明，来自萝卜属、芸薹属等共 7 条 cDNA 3′转录本均按照其来源分别聚在一起，其中，就 *BcMF13* 基因的进化而言，萝卜和野萝卜的亲缘关系更近一些。序列同源比对也显示出 3′不同转录本在同一物种中的差异要远低于在物种间的差异。并且，越靠近 3′末端，序列差异越大，充分反映出 *BcMF13* 基因在该区域的多态性。

3　讨论

花粉发育是一个复杂的生物学过程，是受多基因共同调控的结果，但是，已明确的具体调控过程并不多（李焰焰和曹家树，2010）。*BcMF13* 表达分析表明，*BcMF13* 在可育株系‘*Bajh97-01B*’的 IV–V 级花蕾中特异表达，且主要集中在雄蕊中，在不育株系‘*Bajh97-01A*’中没有检测到表达。我们已证明 *BcMF13* 是与十字花科芸薹属植物白菜的花粉发育密切相关的基因（Li 等，2008，2009）。虽然在小麦等作物中发现过一个

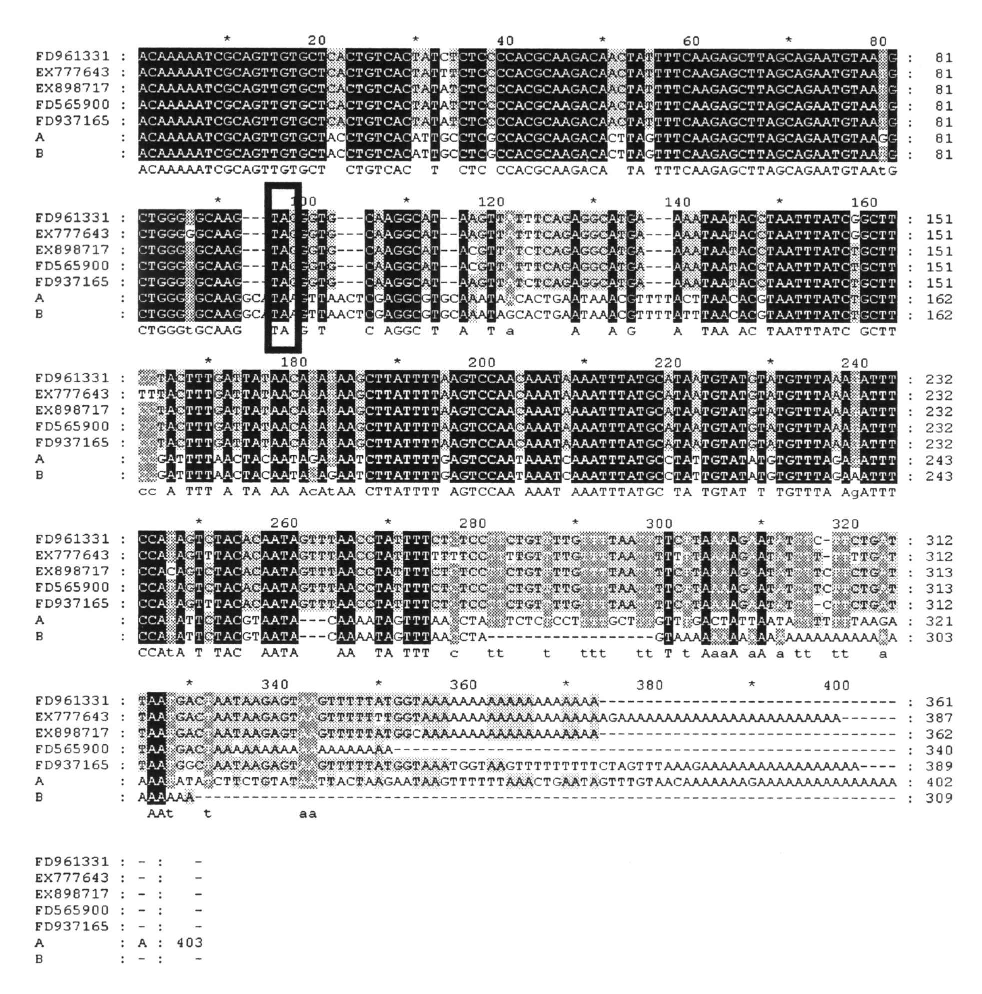


图 3　*BcMF13* 3′不同转录本及同源 EST 序列的比对

A 为 *BcMF13* 长的 3′转录本、B 为 *BcMF13* 短的 3′转录本，FD961331、EX777643、EX898717、FD565900、FD937165 是萝卜属植物的 cDNA，方框内是终止密码子。碱基背景从深到浅色分别表示相似性从高到低

Fig. 3　Alignment different lengths of 3′ transcriptions from *BcMF13* and EST sequences

A was long 3′ transcription of *BcMF13*, B was shot 3′ transcription. FD961331, EX777643, EX898717, FD565900, FD937165 belongs to *Raphanus sativus* Nucleotides in the box are stop codons. Background color from dark to light represent similar from high to low

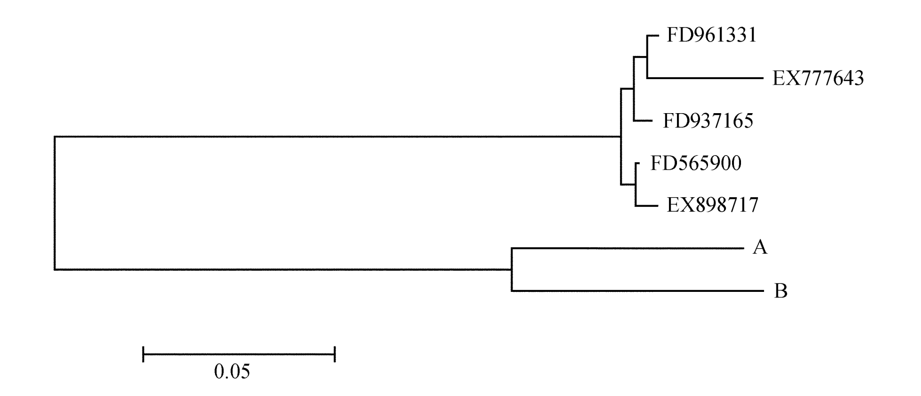


图4 根据Kimura双参数模型，用NJ法构建的*BcMF13*各同源基因间的相互关系树

图中数字为自举检验置信值（1000个复制序列）。A为*BcMF13*长的3′转录本、B为*BcMF13*短的3′转录本

Fig. 4 Molecular phylogenetic trees based on homologous *BcMF13* sequences using NJ method by Kimura′s two-parameter model

Numbers on the tree represented confidence values from bootstrap test (1000 replicates). A was long 3′ transcription of *BcMF13*, B was shot 3′ transcription of *BcMF13*

基因产生不同转录本的现象（Jin和Bian，2004），但*BcMF13*基因3′不同转录本的发现和报道还是首次。进一步分析其核酸和推导的蛋白结构，发现*BcMF13*编码的蛋白包含有两个N-豆蔻酰化位点、一个N-糖基化位点，在N末端还有信号肽。多个生物活性位点表明*BcMF13*在执行生理功能时很活跃，可能蛋白成熟前还需要信号肽切割（Li等，2008）。结合其3′有不同转录本的现象，可以推测，*BcMF13*很可能在白菜以及其它十字花科植物的花粉发育过程中发挥重要的作用。

〔参 考 文 献〕

Cao JS (曹家树), Cao SC (曹寿椿), Yi QM (易清明), 1995. RAPD analysis on genomic DNA of Chinese cabbage and the other groups of *Brassica* [J]. *Acta Horticulturse Sinica* (园艺学报), **22** (1): 47—52

Huang L, Cao JS, Ye WZ *et al.*, 2008. Transcriptional differences between the male sterile mutant bcms and wild type of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* reveal genes related to pollen development [J]. *Plant Biology*, **10** (3): 342—55

Jin YF, Bian TF, 2004. Isolation and partial characterization of a novel pollen-specific cDNA with multiple polyadenylation sites from wheat [J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **36** (7): 467—476

Li YY, Cao JS, Huang L *et al.*, 2008. *BcMF13*, a new reproductive organ-specific gene from *Brassica rapa* ssp. *chinensis*, affects pollen development [J]. *Molecular Biology Reports*, **35** (2): 207—214

Li YY, Cao JS, 2009. Morphological and functional characterization of *BcMF13* in the antisense-silenced plants of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *parachinensis* [J]. *Molecular Biology Reports*, **36** (5): 929—937

Li YY (李焰焰), Cao JS (曹家树), 2010. Isolation and molecular characterization of RALF-Like gene *BcRALF* from *Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino var. *parachinensis* [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **32** (2): 147—150

Li YY, Nie CP, Cao JS, 2011. Isolation and characterization of a novel *BcMF14* gene from *Brassica campestris* ssp. *chinensis* [J]. *Molecular Biology Reports*, **38**: 1821—1829

Ye WZ, Cao JS, Xiang X *et al.*, 2003. Molecular cloning and characterization of the genic male sterility related gene CYP86MF in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino var. *communis* Tsen et Lee) [J]. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **78**: 319—323

Yu XL, Cao JS, Ye WZ *et al.*, 2004. Construction of an Antisense CYP86MF gene plasmid vector and production of a male-sterile Chinese cabbage transformant by the pollen-tube method [J]. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **79**: 833—839

Zhang T (张弢), 2009. Molecular cloning and bioinformatic analysis of *BoPGIP1* Gene from *Brassica oleracea* var. *italica* P [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* (华北农学报), **24** (3): 26—30